



MAIL STOP PATENT  
Attorney Docket No. 25908

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

YOKOYA et al.

Serial No. 10/771,337

Filed: February 5, 2004

For: GENE PANEL PARTICIPATIVE IN HEPATIC STELLATE CELL  
ACTIVATION

TRANSMITTAL LETTER

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith for filing in the U.S. Patent and Trademark Office are the following:

- (1) Transmittal Letter;
- (2) Request for Priority; and
- (3) Priority document no. 2001-240974.

Respectfully submitted,

**NATH & ASSOCIATES PLLC**

By: 

Todd L. Juneau  
Registration No. 40,669

Date: March 9, 2004  
NATH & ASSOCIATES PLLC  
1030<sup>th</sup> 15<sup>TH</sup> Street, NW - 6<sup>th</sup> Floor  
Washington, D.C. 20005  
TLJ:ayd

Customer No. 20529



MAIL STOP PATENT  
Attorney Docket No. 25908

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:

YOKOYA et al.

Serial No. 10/771,337

Filed: February 5, 2004

For: GENE PANEL PARTICIPATIVE IN HEPATIC STELLATE CELL  
ACTIVATION

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

In the matter of the above-identified application, notice is hereby given that the Applicants claim as priority date, August 8, 2001, the filing date of the corresponding application filed in Japan, bearing Application Number 2001-240974.

A Certified Copy of the corresponding application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

**NATH & ASSOCIATES PLLC**

Date: March 9, 2004

By: Todd L. Juneau  
Todd L. Juneau  
Reg. No. 40,669

Customer No. 20529

**NATH & ASSOCIATES PLLC**  
6<sup>TH</sup> Floor  
1030 15<sup>th</sup> Street, N.W.  
Washington, D.C. 20005  
(202)-775-8383  
TLJ:ayd

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2001年 8月 8日  
Date of Application:

出願番号 特願2001-240974  
Application Number:  
[ST. 10/C]: [JP 2001-240974]

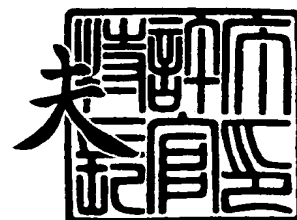
出願人 味の素株式会社  
Applicant(s):



2004年 2月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井 康夫



出証番号 出証特2004-3006606

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-8760

【提出日】 平成13年 8月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 肝星細胞活性化に関与する遺伝子パネル

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬  
研究所内

【氏名】 横屋 史彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬  
研究所内

【氏名】 高原 義之

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社医薬  
研究所内

【氏名】 奥津 倫久

【特許出願人】

【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 0 3 - 3 6 6 9 - 6 5 7 1

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝星細胞活性化に關与する遺伝子パネル

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 肝星細胞で、静止期に比べて活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子の名称及びそれらの遺伝子発現プロファイルからなる遺伝子パネル。

【請求項 2】 前記遺伝子の発現レベルの上昇が、モデル動物における正常時の発現レベルに対する、肝硬変・肝線維化動物モデルにおける発現レベルの差である請求項 1 記載の遺伝子パネル。

【請求項 3】 前記発現プロファイルが、活性化肝星細胞における経時的な発現プロファイルを含む請求項 1 又は 2 に記載の遺伝子パネル。

【請求項 4】 前記モデル動物がラットである請求項 2 または 3 に記載の遺伝子パネル。

【請求項 5】 表 1 ～ 4 の番号 1 ～ 1 0 5 に示す 1 0 5 種の遺伝子のうち、少なくとも 5 種類の各遺伝子の発現プロファイルを含む請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の遺伝子パネル。

【請求項 6】 肝星細胞中で、静止期に比べて活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子の群からなる遺伝子パネルの作成方法であって、以下のステップを含む方法：

(a) 静止期の肝星細胞における各種遺伝子の発現レベルと、活性化時期の肝星細胞における前記遺伝子の発現レベルを測定するステップと、

(b) それぞれの発現レベルを比較するステップと、

(c) 活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子群を同定するステップ。

【請求項 7】 前記ステップ (a) において、肝星細胞における前記遺伝子の発現レベルを経時的に解析することを特徴とする請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 前記遺伝子発現レベルの解析を、遺伝子チップ法により行う請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】 モデル動物もしくは肝臓の組織または細胞に薬剤を投与し、請求項 1 記載の遺伝子パネルを構成する遺伝子の発現プロファイリングを行うことを特徴とする、肝星細胞活性化に關与する薬剤のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、肝星細胞中で正常時に比べて肝星細胞の活性化に伴い発現レベルが上昇する遺伝子の群からなる遺伝子パネル、その作成方法、同遺伝子パネルの利用に関するものである。これらの発明は、診断、医薬分野等で有用である。

## 【0002】

## 【従来の技術】

肝の結合組織の増生および蓄積は、肝の循環傷害を招来する。これが更に肝実質細胞障害原因になり、悪循環が形成され、更なる結合組織の増生および蓄積がおこり、肝硬変や肝線維化モデル動物の肝線維化をとまなう肝疾患を引き起こすと考えられている。肝臓は実質細胞（肝細胞）と非実質細胞（肝星細胞、クッパー細胞、類同内皮細胞、Pit細胞）から成り、肝臓の結合組織は細胞外基質とそこに局在する細胞から構成されている。結合組織中の基質産生担当細胞である肝星細胞が活性化され形質転換することにより結合組織の増生・蓄積が促進される。正常肝臓の肝星細胞（以下、静止期の星細胞と呼ぶ）は、細胞外基質の生産量が少なく、活性化にともない筋線維芽様細胞に形態を変化させ、細胞の増加と共に多量の細胞外基質を合成することが知られている。

## 【0003】

したがって、肝硬変など肝線維化をとまなう肝疾患患者の肝星細胞の活性化を抑制し、結合組織の増生・蓄積を軽減する医療が要求されており、肝星細胞の活性化を抑制させる薬剤のスクリーニングは重要であるといえる。このような要求があるにも関わらず、肝星細胞の活性化を抑制する薬物の効率的なスクリーニング法は知られていない。

## 【0004】

肝疾患により肝細胞が壊死に陥るとそれまで静止期にあった肝星細胞は肝壊死細胞に由来する液性因子や、炎症局所の活性化クッパー細胞や浸潤した炎症細胞などがパラクライン分泌したサイトカインにより、更に、活性化された肝星細胞のオートクライン分泌によって活性化される。ここで、肝星細胞活性化は複数の

因子の関与が考えられているが、いかなるタイミングで働いているのか全体像はわかっていない。そこで、肝星細胞の活性化の全体像をつかむためには、肝星細胞の活性化には複数の遺伝子が関与していると考えられることから、肝星細胞活性化に働く重要遺伝子を多数調べることが重要であると考えられる。これまで、肝星細胞活性化を抑制する薬剤のスクリーニングから生まれた薬剤は無い。肝星細胞活性化に発現変動が見られることを指標とした遺伝子スクリーニングの報告はあったが、せいぜい数種の遺伝子の発現変動を見たものに過ぎなかった。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記観点からなされたものであり、肝星細胞で、静止期に比べて肝星細胞が活性化した時に発現レベルが変動する遺伝子の群からなる遺伝子パネル、及びそれを利用して肝星細胞の活性化を抑制させる薬物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、肝星細胞の活性化を抑制させるためには、肝星細胞の活性化に関与する遺伝子の挙動を、静止期の肝星細胞の遺伝子発現パターンに近づけてやればよいと考えた。そして、肝星細胞初代培養系での活性系モデルを用いて、肝星細胞の活性化における各種遺伝子の発現プロファイルを調べ、肝星細胞に関与する遺伝子に関する発現情報を取得した結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

#### 【0007】

(1) 肝星細胞で、静止期に比べて活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子の名称及びそれらの遺伝子の発現プロファイルからなる遺伝子パネル。

(2) 前記遺伝子の発現レベルの上昇が、モデル動物における正常時の発現レベルに対する、肝硬変・肝線維化モデル動物における発現レベルの差である(1)の遺伝子パネル。

(3) 前記発現プロファイルが、肝星細胞における経時的な発現プロファイルを含む(1)又は(2)の遺伝子パネル。

(4) 前記モデル動物がラットである(2)または(3)の遺伝子パネル。

(5) 表1～4の番号1～105に示す105種の遺伝子のうち、少なくとも5種類の各遺伝子の発現プロファイルを含む(1)～(4)のいずれかの遺伝子パネル。

(6) 肝星細胞中で、正常時に比べて肝星細胞活性化時期に発現レベルが変動する遺伝子の群からなる遺伝子パネルの作成方法であって、以下のステップを含む方法：

(a) 静止期の肝星細胞における各種遺伝子の発現レベルと、活性化時期の肝星細胞における前記遺伝子の発現レベルを測定するステップと、

(b) それぞれの発現レベルを比較するステップと、

(c) 活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子群を同定するステップ。

(7) 前記ステップ(a)において、肝星細胞活性化時期における前記遺伝子の発現レベルを経時的に解析することを特徴とする(6)の方法。

(8) 前記遺伝子発現レベルの解析を、遺伝子チップ法により行う(6)又は(7)の方法。

(9) モデル動物または肝臓の組織もしくは細胞に薬剤を投与し、(1)の遺伝子パネルを構成する遺伝子の発現プロファイリングを行うことを特徴とする、肝星細胞活性化に関与する薬剤のスクリーニング方法。

#### 【0008】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0009】

##### <1>本発明の遺伝子パネル

本発明の遺伝子パネルは、肝星細胞で、静止期に比べて活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子の名称及びそれらの遺伝子発現プロファイルからなる遺伝子パネルである。

本発明の遺伝子パネルは、下記ステップにより作成することができる。

#### 【0010】

(a) 静止期の肝星細胞における各種遺伝子の発現レベルと、活性化時期の肝星細胞における前記遺伝子の発現レベルを測定するステップと、

- (b) それぞれの発現レベルを比較するステップと、
- (c) 活性化時期に発現レベルが上昇する遺伝子群を同定するステップ。

#### 【0011】

肝星細胞の機能は、ビタミンAの代謝と貯蔵、細胞外基質の産生、サイトカインの産生、収縮運動、筋線維芽細胞への形質転換であり、これらの機能が肝線維化に密接に関係していると考えられている。活性化時期の肝星細胞（活性化した肝星細胞又は活性化型肝星細胞と同義である）とは、正常肝の静止期の肝星細胞が様々な刺激により、筋線維芽様細胞へ形質転換した状態の肝星細胞をいう。筋線維芽細胞へ形質転換した細胞は、増殖性が増し、ビタミンA含量が低下し、収縮性を増す。また、タイプI型コラーゲンを主とする細胞外基質を産生する。さらに、更にコラゲナーゼやゼラチナーゼなどの細胞外基質分解酵素の合成が低下するため、細胞外基質の増性・蓄積を促進する。

#### 【0012】

活性化された肝星細胞は、分離肝星細胞で同様な形質転換が起ることが知られている。肝疾患、例えば、肝炎(J hepatology 1996 Mar 24, (3):301-7 Guido M liver stellate cells in chronic viral hepatitis:the effect of interferon therapy)、肝硬変 (American Journal of pathology 1990 July 137(1) Stefano M et al. Cellular Localization of TypeI,III, and IV Procollagen Gene transcripts in Normal and Fibrotic Human liver)、NASH(nonalcoholic steatohepatitis)(Hum Pathol 2000 July 31(7)822-8, Washington K, et al Hepatic stellate cell activation in nonalcoholicsteatohepatitis and fatty liver.)などでは、肝臓の炎症の持続と共に肝に結合組織が増加、蓄積を起こし、活性化型肝星細胞増加が観察される。

#### 【0013】

遺伝子の発現レベルとは、遺伝子の発現量、発現強度又は発現頻度と同義であり、通常、遺伝子に対応する転写産物の生成量、又はその翻訳産物の活性等により解析される。

#### 【0014】

遺伝子の発現レベルは、通常遺伝子の発現解析に利用されている方法を用いて

測定することができる。好ましい方法としては、例えば、遺伝子チップ法、遺伝子マイクロアレイ法、及び遺伝子マクロアレイ法等がある。いずれも、遺伝子断片を何等かの板の上(通常はスライドガラス)に、並べて張り付けたものが用いられる。このチップと蛍光ラベルしたmRNAをハイブリダイズさせて、mRNAの種類と量を測定する。

#### 【0015】

その他、遺伝子発現解析法として、ATAC-PCR法 (Nucleic Acids Reserch 25,4 694-4696(1997))Body Map法 (Gene, 174, 151-158 (1996))、Serial analysis of gene expression (SAGE) 法 (米国特許第527,154号、第544,861号、欧州特許公開第0761 822号)、MAGE (Micro-analysis of Gene Expression) (特開2000-232888号) 等が挙げられる。

#### 【0016】

ATAC-PCR法の概略は、以下の通りである。まず、5' ビオチン化オリゴdTプライマーを用いて合成したcDNAから二本鎖DNAを合成し、これを特定の制限酵素(ここではMboIを用いた例について述べる)で切断する。次に、この制限酵素で切断された部位と共通の配列を末端に持つアダプター(長さの異なる6種類を用意する)と、制限酵素MboIで切断した二本鎖DNAを、DNAライゲースにより連結する。尚、6種類のアダプターのうち、3種類をコントロールcDNA(活性化時期の肝星細胞から調製したcDNA)に結合し、10:3:1の比率で混合する。残る3種類のアダプターに、非コートプラスチックシャーレで培養後4時間、3日、7日のラット肝星細胞から調製したcDNAを結合させる。

#### 【0017】

それぞれの連結反応物を混合した後、ストレプトアビジンコートされたビーズを用いて二本鎖cDNAの3'断片を回収し、各アダプターに共通する配列を持つプライマーを用いて競合的RT-PCRを行う。このPCR産物を、ABI PRISM 3700 DNA Analyzerにより解析する。この装置は、キャピラリー電気泳動により、断片の長さ毎に分離することができ、発現量に比例した蛍光強度を検出することができる。

#### 【0018】

Body Map法の概略は以下の通りである。mRNAをベクター上のポリT配列とmRNA

の3'末端にあるポリAテールを結合させ、ベクターポリT配列をプライマーとしてcDNAを合成する。更に、制限酵素MboIでcDNAを切断する。MboIサイトはcDNA上で平均300塩基対に一つあるため、ベクター上のcDNAは平均300塩基対に分断される。このとき、最もポリAテールよりのcDNAは、ベクターに結合したまま残る。このcDNA断片を持つベクターを開環させ、それを大腸菌に導入してcDNAライブラリーを作製する。ライブラリーから約1000クローンを任意に選択して、それぞれについて平均300塩基対の塩基配列を決定する。それらの配列の中から同じ配列を含むクローン毎にまとめて、それぞれの配列の種類と出現頻度を算出して遺伝子発現プロファイルを得る。各cDNA配列はデータバンクとのホモロジー検索（BLAST検索）を行い、既知の遺伝子と同一の配列を有するクローンにはその遺伝子の名称を与える。配列がデータバンクに登録されていない場合は、その配列に該当する遺伝子は存在しないものとする。

#### 【0019】

BLAST検索によりホモロジー検索を行なうためには、最低11塩基対の情報が必要である。10塩基からなる配列の種類は約百万種であり、人で存在すると予想される遺伝子の種類10万種を遙かに越える。すなわち、11塩基対の情報があれば、その配列を持つ遺伝子は特定することができ、遺伝子発現プロファイル解析が可能である。したがって、多量のシーケンスを必要とするBody Mapによる遺伝子発現プロファイル解析を効率化するために、Body Mapにおける約300塩基対のcDNA断片を、更に11塩基対以上の短い断片（「タグ（tag）」と呼ばれる）とし、更にこの断片同士を多数連結してベクターに挿入することにより、連結タグのライブラリーを作製し、Body Mapと同様に約1000クローンを任意に選択して、連結タグのDNA配列を決定すれば、Body Mapと同じ手数でより多くの遺伝子発現情報を得ることが期待できる。タグは遺伝子配列を代表し、タグの出現頻度はその遺伝子の発現頻度を現す。通常、1回のシーケンスで判読出来るDNA配列の長さは約600塩基対であるから、1回のシーケンスで最大50個程度のタグのDNA配列を判読出来る。すなわち、Body Map法に比べて最大約50倍の効率で、遺伝子発現プロファイル解析を行うことが可能になる。

#### 【0020】

SAGE法は、上記の考えに基づいた遺伝子発現プロファイル解析法である。SAGE法は、以下のようにして行われる。ビオチンが3'末端に結合したポリTをプライマーとしてcDNAを作製し、Body Mapと同様にMboI等の制限酵素（「アンカリング酵素(anchoring enzyme)」と呼ばれる）でcDNAを切断した後、ビオチンが結合した3'末端を含むcDNA断片をアビジンビーズに吸着させ、ビーズを二分して、それぞれのビーズに吸着したcDNA断片（約13bp）に2種のリンカー（A又はB）の一方ずつを結合させる。各リンカーにはBsmFIのようなClass II制限酵素（「タグ化酵素(tagging enzyme)」と呼ばれる）のサイトを含ませておく。タグ化酵素でcDNA断片をビーズから切り出し、切断部位を平滑化し、Aリンカーに接続するタグとBリンカーに接続するタグを連結させる。これは、ダイタグ（ditag）と称される。AリンカーとBリンカーを認識するプライマーを用いてPCRによりダイタグを増幅する。増幅されたダイタグ同士を多数連結させてベクターに組み込み、シーケンスする。1シーケンスで最大50程度のタグシーケンスを得ることができる。このタグシーケンス情報を集計して、遺伝子発現頻度を導き出す。

#### 【0021】

MAGE法は、上記方法に対する改良法であり、ポリT配列を有するベクタープライマーを用いてmRNAからcDNAを合成し、同ベクター上でcDNA配列をタグ化し、得られたタグを、タグの末端が識別できるような配列を介在させて連結することによりコンカテマーを形成させ、このコンカテマーの塩基配列を解析することによって、効率よく、しかも高精度で遺伝子の発現頻度を解析することができる方法である。

#### 【0022】

本発明においては、遺伝子の発現レベルを解析することができる方法であれば特に制限されず、現在知られている方法、及び将来開発される方法のいずれも採用することができる。上記方法のうち、特に好ましいのは、遺伝子チップ法もしくは遺伝子マイクロアレイ法、及びATAC-PCR法である。

#### 【0023】

本発明において、遺伝子の発現レベルの解析は、単独の方法で得られた結果に

基づいて行ってもよく、複数の方法により得られた結果を組み合わせてもよい。単独の方法でも解析は可能であるが、複数の方法を組み合わせると、より精度の高い解析を行うことができる。具体的には、複数の方法、例えば遺伝子チップ法により得られた結果と、ATAC-PCR法により得られた結果について相関係数を算出し、相関係数が一定以上の遺伝子について、発現レベルが変動したと評価する。

#### 【0024】

ヒトやマウス等の動物の遺伝子チップ、遺伝子マイクロアレイ及び遺伝子マイクロアレイは各種市販されており、本発明においてはそれらを使用してもよい。

本発明においては、遺伝子の発現レベルの変動は、静止期の肝星細胞における各種遺伝子の発現レベルと、活性化時期の肝星細胞における前記遺伝子の発現レベルを測定し、それぞれの発現レベルを比較することによって、解析することができる。

#### 【0025】

静止期の肝星細胞における遺伝子の発現レベルは、正常肝から分離した直後の肝星細胞中の遺伝子の発現レベルを測定することによって解析することができる。

一方、活性化時期の肝星細胞における遺伝子の発現レベルは、例えば、正常肝から分離した肝星細胞を非コーティングのプラスチックシャーレで初代培養し、得られる細胞中の遺伝子の発現レベルを測定することによって解析することができる。正常肝から分離した肝星細胞を非コーティングのプラスチックシャーレで初代培養するだけで、自ら活性化して脂肪滴蓄積の減少、細胞外基質の産生など、肝硬変、肝炎など臨床サンプルの肝臓組織で観察される活性化型肝星細胞と類似した形質を示す。

#### 【0026】

肝星細胞をラットの正常肝から分離し、非コーティングしたプラスチックシャーレに播種すると、分離直後の肝星細胞は、ビタミンAを貯蔵する脂肪滴が細胞質に多数観察され正常肝の静止期の肝星細胞と同様な形態を示す。肝星細胞分離後、非コーティングしたプラスチックシャーレ上で培養すると肝星細胞活性化の

マーカーである、 $\alpha$ -smooth muscle actinが培養3日目から観察され、およそ一週間で、肝星細胞は活性化した肝星細胞として筋線維芽細胞様の形態を示す。7日目の活性化肝星細胞は、肝硬変や線維化肝などで観察される脂肪滴が減少した活性化肝星細胞と同様な形質を示す。

#### 【0027】

また、肝星細胞の活性化時期における遺伝子の発現レベルは、例えば、肝硬変・肝線維化モデル動物の肝臓から分離した直後の肝星細胞中における発現レベルを測定することによって解析される。一方、静止期の遺伝子の発現レベルは、正常モデル動物の肝から分離した肝星細胞分離直後に測定される。遺伝子の発現レベルの解析は、肝星細胞活性化にともない経時的に行うことが好ましい。

#### 【0028】

肝硬変・肝線維化モデル動物は、例えば、雄性ラットに、生理食塩水を溶解したチオアセトアミド (50mg/ml) 1mlを1週間に2回ずつ6週間にわたって腹腔内投与することにより取得することができる。この間、ラットは、自由摂食、自由飲水で飼育する。

#### 【0029】

上記のようにして、静止期に比べて活性化時期に発現レベルが変動する遺伝子群が同定される。

#### 【0030】

本発明の遺伝子パネルは、上記のようにして測定される各種遺伝子の名称と、それぞれの遺伝子の発現プロファイル、すなわち発現レベルの変動に関する情報を少なくとも含む。遺伝子の名称は、他の遺伝子と区別することができる限り特に命名法は制限されないが、典型的には、その遺伝子によってコードする産物の名称、GenBank等のデータベース上のアクセッション番号や遺伝子名など、あるいは遺伝子チップ上のプローブセット名や遺伝子名等が用いられる。

#### 【0031】

本発明の遺伝子パネルの好ましい形態においては、各遺伝子は、肝星細胞分離後一定時間における発現レベルによって分類される。例えば、肝星細胞分離3日後（活性化初期）、7日後（活性化型肝星細胞）に増加するグループに分類され

る。ここでいう顕著とは、発現の増加が、肝星細胞の静止期のそれと比べ3倍以上差があるものとする。

#### 【0032】

##### <2>本発明のスクリーニング法

本発明の遺伝子パネルをもとにして、遺伝子パネルに含まれる遺伝子の発現を定量的、半定量的に測定するシステムを構築することにより、各種スクリーニングが可能となる。

#### 【0033】

例えば、肝炎、肝硬変、NASHモデル動物または活性化肝星細胞に薬剤を投与し、本発明の遺伝子パネルを構成する遺伝子の発現プロファイリングを行うことにより、肝星細胞に關与する薬剤のスクリーニングを行うことができる。すなわち、薬剤の投与によって、各遺伝子の発現プロファイルが静止期の肝星細胞遺伝子パネルにおける発現プロファイルと類似するような薬剤は、肝星細胞活性化を阻害すると考えられる。

#### 【0034】

また、本遺伝子パネルの遺伝子の発現増加をさらに増加させる薬剤、もしくは発現減少をさらに減少させる薬剤をスクリーニングすることによっても、肝星細胞活性化抑制物質のスクリーニングが可能である。この場合、5種程度の遺伝子の発現変化に注目することにより、スクリーニングが可能である。

#### 【0035】

遺伝子の発現プロファイリングの方法としては、遺伝子パネルを構成する遺伝子の断片を固定したスライドガラス又はナイロンメンブレン等を用いたDNAマイクロアレイ法、DNAマクロアレイ法、あるいはATAC-PCR法、Taqmanプローブを利用した方法、又はSYBR Greenを利用した定量的PCR法等が挙げられる。発現プロファイリングは、単独の方法で行ってもよく、複数の方法を組み合わせてもよい。

#### 【0036】

以下に、スクリーニングの具体的手順の一例を示す。

第一次スクリーニングとして、スクリーニング対象薬剤で分離活性化型肝星細胞

胞、又は、株化された活性化型肝星細胞を処理し、一定時間後の細胞からRNAを調製する。薬剤処理前後の遺伝子発現レベルを測定し、その発現プロファイルが静止期の星細胞の遺伝子パネルに相似した薬剤をスクリーニングする。薬剤処理後の肝星細胞における遺伝子発現パターンをグループ化し、遺伝子発現パネルの静止期のプロファイリングと相似した薬剤をスクリーニングする。グループ化は、遺伝子パネルの作成と同様にして、一定時間における発現レベルによって分類することによって行われる。

#### 【0037】

細胞内で遺伝子発現産物である蛋白質は、互いに関連し、ネットワークを形成している。直接結合したり、酵素と基質の関係になったりする場合と、蛋白質がゲノムの特定部位と結合し特定遺伝子の転写を制御したりすることによりネットワークができています。肝星細胞活性化においてこれら一連のネットワークが作動し、この作動が次の一連のネットワークを作動するというネットワークのカスケードが考えられる。このカスケードの結果として肝星細胞が活性化し最終的に筋線維芽様細胞へ分化していく。このカスケードに関連するすべての遺伝子発現の変動を集合したものが本パネルである。肝星細胞活性化阻害剤に要求されることは、ネットワークの上流を阻害してネットワークを停止させるか、転写因子を介してカスケードを転写因子の周辺のシグナル伝達を阻害することによりカスケードを止めることが望まれる。これからして有望な阻害剤は本パネルのある遺伝子変動をまとめて生じさせると考えられる。このまとまりは、場合によるが1つのネットワークに関連する遺伝子が10個程度本パネルに含まれていると予想されるので、少なくとも5個の遺伝子が一つの阻害剤で変動すると予想される。よって、少なくとも5個の遺伝子の変動をもって一次スクリーニングとして効果を判断する。

#### 【0038】

肝星細胞の培養条件としては、非コートプラスチックシャーレ上の培養、又は、TGF- $\beta$  (tumor growth factor) など肝星細胞の活性化を促進する物質を加える、等の方法があり、肝星細胞活性化抑制物質、又は肝星細胞増殖を阻害する物質がスクリーニングされることが期待される。

## 【 0 0 3 9 】

第二次スクリーニングとして、一次スクリーニングで肝星細胞の活性化抑制または、肝星細胞の増殖阻害を示すと予想される候補薬物を、肝炎誘導薬剤、肝硬変誘導薬剤、脂肪肝誘導薬剤などで作成した病態モデルラットに投与し、肝臓を摘出する。肝臓の結合組織量を測定するとともに、これからRNAを抽出し遺伝子発現変化を測定する。これらのデータを、薬剤を投与しないラットの肝結合組織量を測定し遺伝子発現変化データと比較し、薬剤の肝結合組織増生や蓄積に対する効果を評価する。

## 【 0 0 4 0 】

上記スクリーニングは、ラット以外の実験動物を利用しても可能であり、その場合、ラット遺伝子に対応するホモログについて遺伝子パネルを作り直し、スクリーニングを実施することが好ましい。

## 【 0 0 4 1 】

以上のように、本発明の遺伝子パネルは、肝星細胞の活性化において有効な薬剤のスクリーニングに有用であると考えられ、その結果得られた薬剤を組み合わせることにより、より有効な肝線維化治療薬を創出することも可能であると考えられる。

## 【 0 0 4 2 】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

## 【 0 0 4 3 】

## &lt; 1 &gt; 肝星細胞の分離

雄性Wistarラット（体重300～350g）をエーテル麻酔後、腹腔内にネンブタールを0.5ml注入し、クーパーにて開腹し、門脈を露出させた。サーフローを門脈のやや末梢側より挿入した。

## 【 0 0 4 4 】

灌流液（1リットルあたり8g NaCl、400mg KCl、88.17mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、120.45mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2380mg HEPES、350mg  $\text{NaHCO}_3$ 、560mg  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）200ml、70mgプロナーゼ灌流液100ml、70mgコラゲナーゼ灌流液250mlを流した。灌流後、肝を摘

出し、細胞を分散させた。それらの細胞を、70mgプロナーゼ、70mgコラゲナーゼ、2mg DNaseI入りの灌流液中で、更に消化させた。

#### 【0045】

その後、上記細胞分散液をメッシュ装置で濾過した後、ファルコンチューブ2本に濾過液を分注し、2000rpmで7分遠心した。上清を捨て、0.5mg DNaseIを加え、更に攪拌溶液（1リットル当たり8g NaCl、370mg KCl、210mg  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、70mg  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、150mg  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、991mgグルコース、227mg  $NaHCO_3$ 、225mg  $CaCl_2$ ）を加えピペッティングをした後、2000rpmで7分遠心した。上清を捨て、67.5mlの攪拌溶液を加えて細胞を懸濁し、Nicodenz溶液（1リットル当たり370mg KCl、210mg  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、70mg  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、150mg  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 $KH_2PO_4$ 、991mgグルコース、227mg  $NaHCO_3$ 、225mg  $CaCl_2$ の溶液25mlに、7.75g Nicodenzを溶解）を加え、攪拌し、遠心チューブに分注した。各々のチューブに1mlの攪拌用液を重層し、3200rpmで15分間遠心した。

#### 【0046】

最上層の下面に細胞層が得られ、この層を吸い取り遠心チューブに移した。攪拌溶液を加えて細胞を懸濁し、2000rpmで7分遠心を行った。沈殿を、10% FCSを加えたDMEMに懸濁し、非コートプラスチックシャーレに播種した。4時間後に培養液を10%FCSを加えたDMEMと交換し、シャーレに接着している細胞を静止期の肝星細胞とした。また、シャーレに接着している細胞を3日間又は7日間培養した細胞をそれぞれ活性化初期の肝星細胞及び活性化した肝星細胞とした。

#### 【0047】

##### <2>全RNAの精製

細胞数 $10^7$ に対し、1mlのISOGEN（日本ジーン）を加え、ホモジェナイズした。得られたホモジネートを遠心し、上清を回収した。この上清に、加えたISOGEN 1mlにつき200 $\mu$ lのクロロホルムを加え、軽く攪拌した。室温に2分放置後、15000回転、4℃で10分間遠心分離し、水層を新しい遠心チューブに移した。この水層に、それと等量の2-プロパノールを加え、室温に5分放置後、15000回転、4℃で15分間遠心した。上清を捨て、沈殿したペレットに70%エタノールを加え、15000回転、4℃で15分間遠心後、70%エタノールを除去することにより、ペレッ

トをリンスした。リンスしたペレットを室温で5分間乾燥させ、これにDEPC（ジエチルピロカーボネート）処理水を加え、ペレットを溶解させた。こうして得られた全RNA画分が精製されたことを、1%アガロースゲル電気泳動により確認した。

#### 【0048】

上記のようにして、分離直後の肝星細胞、培養3日後、7日後における肝星細胞からそれぞれ全RNAを精製し、各種遺伝子発現量の推移を、GeneChip（Affymetrix社製）を利用して調べた。

#### 【0049】

##### <3>GeneChipによる遺伝子発現解析

GeneChipによる遺伝子発現解析は、Affymetrix社が推奨するプロトコールに準拠して行った。以下に手順を示す。

#### 【0050】

##### (1) プローブ合成

##### (i) 二本鎖cDNA合成

まず、<2>で調製した全RNAから、Gibco BRL社製のSUPERSCRIPT Choice Systemを用い、二本鎖cDNA合成を行った。全RNA 15 $\mu$ g、T7-(dT)<sub>24</sub> primer 100pmolをDEPC処理水に溶解し、11 $\mu$ lとした。70℃で10分間反応後、氷冷し、5 $\times$ 1st strand cDNA buffer (Gibco BRL社製) 4 $\mu$ l、0.1 $\times$ DTT（ジチオスライツール、Gibco BRL社製）2 $\mu$ l、10mM dNTP mix（Gibco BRL社製）1 $\mu$ lを加え、42℃、2分間保温した。これに逆転写酵素（Superscript II RT）2 $\mu$ gを加えた後、42℃で1時間反応させた。

#### 【0051】

前記反応液に、DEPC処理水、5 $\times$ 2nd strand reaction buffer 30 $\mu$ l、10mM dNTP 3 $\mu$ l、DNAリガーゼ 10U/ $\mu$ l 1 $\mu$ l、DNAポリメラーゼI 10U/ $\mu$ l 4 $\mu$ l、RNaseH 2U/ $\mu$ lを加えて混合した後、16℃で2時間反応させた。この後、T4 DNAポリメラーゼ 5U/ $\mu$ l 2 $\mu$ lを加え、16℃で5分反応させた。これに、0.5M EDTA 10 $\mu$ lを加えた。この反応液に等量の（フェノール：クロロホルム＝1：1）溶液を加え、これらが入ったチューブを上下に振って混ぜ合わせた。この混合液を、15000r

pm、4℃で10分間遠心分離し、水層を新しい遠心チューブに移した。この水層に、3Mの酢酸ナトリウムを1/10量、100%エタノールを3倍量加え、よく混合した。-80℃で10分放置したのち、15000rpm、4℃で10分間遠心した。沈殿したペレットを70%エタノールで2回リンスし、室温で5分間乾燥した後、DEPC処理水を12μl加えた。

#### 【0052】

##### (ii) ビオチン標識cRNAプローブの合成

次に上記で合成した二本鎖cDNAから、Enzo社製Bio Array High Yield RNA Transcript Labeling Kitを使用して、ビオチン標識cRNAプローブを合成した。二本鎖cDNA 5μl、DEPC処理水 17μl、10×HY buffer 4μl、10×ビオチン標識リボヌクレオチド (Biotin labeled ribonucleotides) 4μl、10×DTT 4μl、10×RNase inhibitor mix 4μl、20×T7 RNAポリメラーゼ2μlを混合し、37℃で4時間反応させた。

#### 【0053】

次に、上記のようにして合成したビオチン標識cRNAプローブ溶液から、未反応のBiotin labeled ribonucleotidesを、Qiagen社製RNeasyを使用して除いた。ビオチン標識cRNAプローブ溶液に、DEPC処理水160μlを加え、RLT buffer 700μlを混合し、ついで100%エタノール500μlを加え、よく混合した。この溶液を、700μlずつRNeasy mini spin columnに加え、8000rpmで15秒間遠心した。溶出液を、再度RNeasy mini spin columnに加え、8000rpmで15秒間遠心した。次に、RPE buffer 500μlをRNeasy mini spin columnに加え、8000rpmで15秒間遠心した。再度RPE buffer 500μlをRNeasy mini spin columnに加え、15000rpmで2分間遠心した。

#### 【0054】

上記のようにしてビオチン標識cRNAプローブを吸着させ、洗浄したRNeasy mini spin columnを、新しい遠心チューブに移した。このRNeasy mini spin columnにDEPC処理水30μlを加え、室温で1分間放置した。8000rpmで15秒間遠心し、精製されたビオチン標識cRNAプローブ溶液を溶出させた。

#### 【0055】

次に、精製されたビオチン標識cRNAプローブ溶液の断片化を行った。ビオチン標識cRNAプローブ溶液、5×Fragmentation buffer（最終溶液量の1/5量を加える）を混合して、ビオチン標識cRNAプローブ濃度が $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるよう調整し、 $94^{\circ}\text{C}$ で35分間反応させた。1%アガロースゲル電気泳動を行い、プローブがおおよそ100塩基前後の長さに断片化されているのを確認した。

#### 【0056】

##### (2) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、まずテストチップ（TEST2 Chip）で断片化ビオチン標識cRNAプローブの出来を評価し、問題がないことを確認した後に本試験を行った。本試験には、ラットチップセット（RG-U34A, RG-U34B, RG-U34C）を用いた。これら3種のラットチップセットには、計7000種のラット既知遺伝子と、17000種の未知遺伝子が含まれている。テストチップ、ラットチップセットのいずれも、以下の手順でハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0057】

断片化ビオチン標識cRNAプローブ  $60 \mu\text{g}$ 、コントロールoligonucleotied B2（5nM） $12 \mu\text{l}$ 、100×control cRNA カクテル  $12 \mu\text{l}$ 、ニシン精子DNA（10mg/ml） $12 \mu\text{l}$ 、アセチル化BSA（50mg/mg） $12 \mu\text{l}$ 、2×MESハイブリダイゼーションバッファ  $600 \mu\text{l}$ を加え、DEPC処理水で $1200 \mu\text{l}$ に調整した（以下、「ハイブリダイゼーションカクテル」と呼ぶ）。ハイブリダイゼーションカクテルを $99^{\circ}\text{C}$ 、5分加熱して熱変性を行い、 $45^{\circ}\text{C}$ に5分間置いた後、15000rpm、室温で5分間遠心した。上清を、テストチップ（TEST2 Chip）では $80 \mu\text{l}$ 、ラットチップセット（RG-U34A, RG-U34B, RG-U34C）では $200 \mu\text{l}$ 分取し、ハイブリダイゼーションに使用した。

#### 【0058】

Genechipを室温にもどし、1×MES buffer（Test2 chipは $80 \mu\text{l}$ 、ラットチップセットは $200 \mu\text{l}$ ）、 $45^{\circ}\text{C}$ で10分、60rpmでプレハイブリダイゼーションを行った。次に、プレハイブリダイゼーション液を除去し、前記の熱変性させたハイブリダイゼーションカクテルを添加し、 $45^{\circ}\text{C}$ 、16時間、60rpmでハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0059】

### (3) 洗浄、染色及びスキニング

Genechipからハイブリダイゼーションカクテルを除去し、non stringent wash bufferを入れ、Fluidic station (Affimetrix社製) にて洗浄及び染色を行った。洗浄及び染色は、Test2 ChipではFluidic stationのMini\_euk1プロトコルに従い、ラットチップセットではEukGE-WS2プロトコルに従って行った。洗浄及び染色終了後、スキャナーにてチップのスキニングを行い、画像データを取り込んだ。

【 0 0 6 0 】

### (4) データ解析

ハイブリダイゼーションのデータ解析は、GeneChipアナリシススイートによって行った。結果を表1～4に示す。各遺伝子の発現量は、全遺伝子の発現の平均値を100とし、それに対する相対値 (Average Differences) で表した。表中、プローブセット (Probe set) 番号は、Affymetrix社によって命名された、各遺伝子に対応する管理用背番号である。ユニジーン (Unigene) はGenBankに登録されたDNA配列を、遺伝子 (転写産物) 種ごと、及び生物種ごとにまとめたものである。

【 0 0 6 1 】

表中の分離直後のカラムは、肝星細胞を分離し非コートプラスチックシャーレに肝星細胞を播種し、4時間後肝星細胞からRNAを調製する。3日目、7日目のカラムは、肝星細胞を非コートプラスチックシャーレで3日間、7日間培養した活性化初期細胞、活性化型肝星細胞の遺伝子発現量である。

【 0 0 6 2 】

正常時の肝臓から分離直後の静止期肝星細胞における発現に比べ、非コートプラスチックシャーレ上で培養した活性化肝星細胞における発現増加が著しい (約3倍以上増加) 既知遺伝子は105種であった。

【 0 0 6 3 】

【表 1】

遺伝子 番号	Probe set 番号	Unigene 番号	分離 直後	3日目	7日目	遺伝子の名称
1	L19927_at	Rn.9723	87	390	421	ATP synthase gamma-subunit (ATP5c)
2	U00926_g.at	Rn.3879	101	466	271	delta subunit of F1F0 ATPase
3	rc_A1008106_at	Rn.3233	231	1668	1559	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase
4	U17565_g.at	Rn.10220	21	189	125	intestinal DNA replication protein
5	rc_AA899854_at	Rn.5821	74	366	206	Topoisomerase (DNA) II alpha
6	rc_A1228738_s.at	Rn.2792	211	930	957	FK506-binding protein 1 (12kD)
7	rc_A1228045_at	Rn.11065	-4	996	1144	regulator of G-protein signaling 4
8	rc_A1229727_at	Rn.1150	83	410	405	regulator of G-protein signaling 5
9	rc_AA851814_at	Rn.13778	308	1767	1748	osteocalcin
10	S49003_s.at	Rn.2178	-41	243	293	short isoform growth hormone receptor [rats, mRNA, 1136 nt]
11	AF023621_at	Rn.11286	7	117	91	sortilin
12	M32062_at	Rn.6050	52	302	550	Fc-gamma receptor
13	J05122_at	Rn.1820	103	692	267	peripheral-type benzodiazepine receptor (PKBS)
14	AB017711_at	Rn.28212	18	202	121	RNA polymerase II
15	M36410_g.at	Rn.6658	74	701	284	sepiapterin reductase
16	AF041066_at	Rn.22804	15	111	133	ribonuclease 4
17	X06916_at	Rn.504	32	730	486	p9Ka homologous to calcium-binding protein
18	rc_AA819338_at	Rn.1999	115	536	624	sepiapterin reductase
19	M80829_at	Rn.9965	45	457	383	Troponin T, cardiac
20	rc_A1013887_at	Rn.2060	145	695	531	BCI2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (Bnip3) ; nuclear gene for mitochondrial product
21	rc_A1009801_at	Rn.2661	77	346	156	macrophage migration inhibitory factor (Mif)
22	L02530_at	Rn.9095	14	147	178	polarity gene (frizzled) homologue
23	rc_A1170366_at	Rn.860	150	752	423	HEPATOMA-DERIVED growth factor
24	M69055_at	Rn.6431	23	167	149	insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-6)
25	X06107_i.at	Rn.6282	6	426	577	insulin-like growth factor I
26	rc_A1234060_s.at	Rn.11372	66	883	1025	Lysyl oxidase
27	M14656_at	Rn.8871	25	1039	988	osteopontin
28	H32867_at	Rn.9526	67	549	283	secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) mRNA, complete cds
29	AF014827_at	Rn.10796	37	160	264	vascular endothelial growth factor D (VEGF-D)
30	X58865mRNA_at	Rn.10981	83	433	264	liver phosphofructokinase
31	X02610_at	Rn.4236	279	914	798	non-neuronal enolase (NNE) (alpha-alpha enolase, 2-phospho-D-glycerate hydrolase EC 4.2.1.11)
32	rc_A1228723_s.at	Rn.1383	89	443	224	phosphoglycerate mutase B isozyme (PGAM)

【0064】

【表 2】

遺伝子番号	Probe set番号	Unigene番号	分離直後	3日目	7日目	遺伝子の名称
33	rc_AA998722_s.at	Rn.1556	194	1298	770	Pyruvate kinase, muscle
34	D89514_at	Rn.11052	24	142	131	5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
35	rc_A1233173_at	Rn.6236	50	297	154	nucleoside diphosphate kinase beta isoform
36	U64030_at	Rn.6102	-1	274	142	dUTPase
37	D00680_at	Rn.1491	195	712	567	plasma glutathione peroxidase
38	rc_A1170353_at	Rn.2554	234	1286	1188	p75NTR-associated cell death executor (Nade)
39	M60753_s.at	Rn.220	-2	440	318	Catecholamine-O-methyltransferase
40	rc_AA859911_g.at	Rn.23404	32	150	167	gal beta 1,3 galNAc alpha 2,3-sialyltransferase
41	rc_A1030409_f.at	Rn.54684	171	965	936	Calreticulin
42	X76985_at	Rn.11404	10	245	261	latexin
43	J03752_at	Rn.2580	19	149	151	glutathione S-transferase
44	rc_A1230260_s.at	Rn.11095	60	298	201	casein kinase II beta subunit (CK2)
45	rc_AA817897_s.at	Rn.2024	195	797	544	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (Bnip3)
46	E12625cds.at		17	169	119	novel protein which is expressed with nerve injury.
47	D13127_g.at	Rn.1817	211	874	621	oligomycin sensitivity conferring protein
48	D32209_at	Rn.10123	24	170	96	Acid nuclear phosphoprotein 32 (leucine rich)
49	rc_A1112012_at	Rn.13778	542	1680	1987	osteocalcin
50	U75917_g.at	Rn.7160	56	415	383	clathrin-associated protein 17 (AP17)
51	U96130_at	Rn.3661	11	124	145	glycogenin
52	rc_AA899914_s.at	Rn.22161	-40	137	166	glycoprotein processing glucosidase I
53	M60322_g.at	Rn.2917	75	341	327	aldose reductase
54	M91597_s.at	Rn.927	368	1321	968	substrate binding subunit of type II 5'-deiodinase D2p29
55	AB016800_at	Rn.228	23	147	139	7-dehydrocholesterol reductase
56	D37920_at	Rn.11036	24	153	152	squalene epoxidase
57	M27207mRNA_s.at	Rn.2953	188	1092	1384	alpha-1 type I collagen
58	X05834_at	Rn.1604	89	806	1256	fibronectin
59	M83107_at	Rn.774	44	1033	849	signal sequence receptor, delta
60	M15474cds_s.at		84	611	979	alpha-tropomyosin
61	M60666_s.at	Rn.1033	103	562	762	alpha-tropomyosin 2
62	rc_AA944275_i.at	Rn.54749	122	556	262	alpha-tubulin
63	X73524_at	Rn.1657	40	236	33	desmin
64	rc_AA946377_at	Rn.1239	102	460	511	nonmuscle myosin heavy chain-B mRNA
65	rc_A1175789_at	Rn.6321	8	295	368	smooth muscle alpha-actin

【0065】

【表 3】

遺伝子 番号	Probe set 番号	Unigene 番号	分離 直後	3日目	7日目	遺伝子の名称
66	X06801.cds.i.at		6	1219	1301	vaskular alpha-actin
67	rc.A1009426.at	Rn.10	292	359	1338	SM22
68	S83358.s.at		27	170	205	focal adhesion kinase/pp125FAK/FAK
69	X60767mRNA.s.at	Rn.6934	14	168	66	cdc2
70	D14014.g.at	Rn.947	39	20	354	cyclin D1
71	D16309.at	Rn.9483	150	594	692	cyclin D3
72	L11007.at	Rn.6115	176	692	711	cyclin-dependent kinase 4 (cdk4)
73	X06564.at	Rn.11283	-46	231	428	140-kD NCAM polypeptide
74	X62660mRNA.at		11	147	144	glutathione transferase subunit 8
75	S69874.s.at		216	858	940	cutaneous fatty acid-binding protein
76	L03294.at	Rn.3834	71	336	722	lipoprotein lipase
77	S81497.s.at		42	241	247	lysosomal acid lipase
78	U67995.s.at/AF036761.at	Rn.2627	53	229	176	stearyl-CoA desaturase 2
79	rc.A1230712.at	Rn.950	-21	123	159	Subtilisin - like endoprotease
80	rc.AA850334.at	Rn.11187	14	100	70	Sulfonylurea receptor
81	AJ007291.g.at	Rn.30105	105	405	272	CAP1
82	rc.A1169631.s.at	Rn.29754	4	169	107	prohibitin (phb) mRNA
83	X98517.at	Rn.10516	56	531	1017	macrophage metalloelastase (MME)
84	D30804.g.at	Rn.19891	167	635	512	proteasome subunit RC6-1
85	D10952.i.at	Rn.6686	129	598	433	cytochrome c oxidase subunit Vb
86	M89945mRNA.at		124	570	357	farnesyl diphosphate synthase
87	rc.A1180442.at	Rn.2622	-2	152	81	testis-specific farnesyl pyrophosphate synthetase
88	rc.AA892775.at	Rn.2283	63	610	853	Lysozyme
89	D00753.at	Rn.128	10	981	443	contrapsin-like protease inhibitor
90	rc.A1227671.at	Rn.7219	27	194	215	steroidogenic acute regulatory protein (STAR) mRNA, complete cds
91	rc.A1228830.s.at	Rn.24366 /Rn.2627	127	826	496	Scd2 mRNA for stearyl-CoA desaturase 2
92	rc.AA900582.at	Rn.780	158	197	929	Alpha-2-macroglobulin
93	S87522.g.at		-16	360	435	leukotriene A4 hydrolase
94	D14441.at	Rn.55102	99	383	360	NAP-22 mRNA for acidic membrane protein of rat brain
95	L16532.at	Rn.31762	29	222	157	2,3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPII)
96	L11319.at	Rn.24875	52	262	193	signal peptidase
97	D00569.g.at	Rn.2854	11	163	100	12,4-dienoyl-CoA reductase

【0066】

【表 4】

遺伝子 番号	Probe set 番号	Unigene 番号	分離 直後	3日目	7日目	遺伝子の名称
98	D00729.g.at	Rn.48805	-36	157	110	delta3, delta2- enoyl-CoA isomerase
99	AA799336.at	Rn.1318	27	183	138	Moderately similar to Acyl carrier protein, Mitochondrial
100	D00636Poly.A.Site#1_s.at		153	570	508	NADH-cytochrome b5 reductase
101	AA685112.at	Rn.3373	15	149	123	similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase
102	U62635.s.at	Rn.1608	-16	138	100	ribosomal protein L23-related product homolog
103	X59375mRNA.at	Rn.34330	211	861	936	ribosomal protein S27
104	rc.AA875269.at	Rn.2627	67	487	440	ribosomal protein L21
105	D30649mRNA.s.at	Rn.44	2	280	193	phosphodiesterase I

【0067】

【発明の効果】

本発明より、肝星細胞に關与する遺伝子の発現情報が提供される。同発現情報を利用して、肝星細胞の活性化を抑制する薬物等をスクリーニングすることができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肝星細胞で、静止期に比べて活性化した肝星細胞に発現レベルが上昇する遺伝子の群からなる遺伝子パネル、及びそれを利用して肝星細胞の活性化を抑制する薬物をスクリーニングする方法を提供する。

【解決手段】 肝星細胞で、正常時に比べて肝星細胞活性化時期に発現レベルが変動する遺伝子の群からなる遺伝子パネルを、以下のステップにより作成する：

(a) 正常時におけるモデル動物より分離した静止期肝星細胞における各種遺伝子の発現レベルと、活性化時期における前記遺伝子の発現レベルを測定するステップと、

(b) 活性化時期に発現レベルが変動する遺伝子群を同定するステップ。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 1 - 2 4 0 9 7 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 0 0 6 6 ]

1. 変更年月日	1 9 9 1 年 7 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区京橋 1 丁目 1 5 番 1 号
氏 名	味の素株式会社